4.วิจารณ์

4.1 การทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสและความสัมพันธ์กับปริมาณไนเทรตที่สะสมอยู่ในใบข้าวไร่

จากการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอม กู้เมืองหลวง และขาวดอกมะลิ105 พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์นี้มีมากที่สุดในช่วงแรกของการปลูกซึ่งเป็นช่วงที่ปุ๋ยในดินยังมีปริมาณมาก จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงแบบขึ้นๆลงๆโดยมีลักษณะเหมือนกันทั้งสามสายพันธุ์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเป็นผลจากการมีความผันแปรของระดับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบสูง เนื่องจากเคยมีรายงานการทดลองเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบถั่วแขก *Phaseolus vulgaris* ที่ตำแหน่งต่างๆ กันของต้น พบว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบที่อยู่ส่วนยอดมีแอคติวิตีสูงที่สุด และจะลดลงเมื่อใบอยู่ในตำแหน่งที่ต่ำลงมา (Silveira *et al*., 2001) นอกจากนี้ในการศึกษาในพืชกลุ่ม marine angiosperm พบว่า ปัจจัยของใบเก่า และใบใหม่ ก็มีผลต่อระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสด้วยเช่นกัน โดยในสภาวะที่มีแสงพบว่าใบใหม่มีแอคติวิตีสูง ในขณะที่ใบเก่าจะมีแอคติวิตีต่ำมาก(Toucheffe and Burkholder, 2001) ดังนั้นแม้ว่าในการทดลองนี้จะเลือกใบข้าวซึ่งอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (ใบที่ 2 จากยอด) แล้วก็ตาม ก็อาจมีผลจากอายุของหน่อที่แตกออกมา ซึ่งจะทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์มีความไม่คงที่โดยเฉพาะเมื่อต้นข้าวมีอายุมากขึ้นและมีหน่อเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ปัจจัยสิ่งแวดล้อมก็ยังมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย แม้ว่าในการทดลองจะได้เก็บตัวอย่างใบข้าวที่เวลาเดียวกันเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไปตามช่วงเวลาของวัน แต่เนื่องจากช่วงเวลาที่ได้ทำการทดลองอยู่ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน ดังนั้นในธรรมชาติ สภาพลมฟ้าอากาศจะไม่คงที่ทุกวัน เช่น บางวันมีฝนตกตลอด ขณะที่บางวันมีแดดจ้า ก็จะทำให้พืชได้รับแสงแตกต่างกัน และมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส อย่างไรก็ตาม แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ก็มีแนวโน้มลดลง จนเหลือน้อยมากในช่วงเวลา 45-53 วันนับจากวันปลูก

การพิจารณาปริมาณไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวควบคู่ไปด้วยพบว่าระดับปริมาณไนเทรตในใบข้าวก็มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งการที่ไนเทรตมีปริมาณน้อยลงนี้อาจเนื่องมาจาก

การที่ต้นข้าวนำไปใช้ในการเจริญ และแตกกอ อย่างไรก็ตามการลดลงของระดับไนเทรตในใบจะไม่ลดถึงระดับศูนย์ แม้ว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงถึงจุดต่ำสุด ทั้งนี้เนื่องจากปกติ พืชจะมีการรักษาสมดุลย์ของแร่ธาตุเอาไว้ภายในต้น (Chrispeels *et al*., 1999) เมื่อเติมปุ๋ยให้แก่ต้นข้าวทั้งสามสายพันธุ์ในระยะนี้พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสามารถเพิ่มขึ้นสูงภายในเวลาไม่เกินสิบวัน จากการพิจารณาระดับไนเทรตในใบข้าวในระยะนี้ควบคู่ไปด้วยพบว่าเมื่อต้นข้าวได้รับปุ๋ยก็จะมีระดับไนเทรตในใบเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน แสดงถึงการมีความสัมพันธ์กันระหว่างค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสกับการได้รับปุ๋ยไนโตรเจน

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กู้เมืองหลวง ดอกพยอม และขาวดอกมะลิ105 พบว่าข้าวทั้งสามสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อปุ๋ยในลักษณะของการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสูงที่สุดรองลงมาได้แก่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และข้าวพันธุ์ดอกพยอมมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสต่ำที่สุด ซึ่งผลดังกล่าวแสดงถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ ชัดเจนเมื่อพิจารณาจากระดับความสามารถในการตอบสนองของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าวต่อปุ๋ยที่ได้รับ นอกจากนี้ยังมีความสอดคล้องกับการทดลองของ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ (2528) ซึ่งได้ศึกษาการตอบสนองของปุ๋ยในข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง และดอกพยอมในแปลงทดลองโดยพิจารณาในแง่ผลผลิตที่ได้ พบว่าข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีการตอบสนองต่อปุ๋ยสูงกว่าพันธุ์ดอกพยอมเช่นเดียวกัน

จากการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่ที่ปลูกในสภาวะธรรมชาติ มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาที่ปลูก ซึ่งปัจจัยของสภาวะแวดล้อม เช่น แสงหรืออุณหภูมิเป็นเรื่องยากที่จะควบคุม สิ่งหนึ่งที่เกษตรกรสามารถควบคุมได้คือการใส่ปุ๋ย

ผลการทดลองนี้สนับสนุนถึงการให้ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราและเวลาที่เหมาะสมจะมีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวอย่างชัดเจน นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมีความสัมพันธ์กับช่วงเวลาที่ใส่ปุ๋ย โดยจากการทดลองใส่ปุ๋ยรองพื้นให้แก่ต้นข้าวในปริมาณเดียวกับที่ใช้จริงในพื้นที่ปลูกข้าวไร่ ชาญ มงคล (2536) พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงในช่วงเวลาประมาณหนึ่งเดือนครึ่งหลังจากเริ่มปลูก ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ต้นข้าวจำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนมากเพื่อการเจริญ

ของกอ และเริ่มสร้างช่อดอก การให้ปุ๋ยในระยะนี้จึงมีความจำเป็นต่อต้นข้าวมาก เช่นเดียวกับในทางปฏิบัติ ชาญ มงคล (2536) ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้ปุ๋ยในนาข้าว คือ ควรให้ปุ๋ยสองครั้ง ได้แก่ปุ๋ยรองพื้น (basal dressing) และใส่ปุ๋ยครั้งที่สองเมื่อข้าวแตกกอสูงสุดหรือก่อนสร้างช่อดอก

4.2 การศึกษาอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

4.2.1 ผลของแสงต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในช่วงวัน

จากการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงอายุ 2 เดือน ที่ปลูกในดิน ได้รับแสงตามธรรมชาติ และ ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบและรากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงอายุ 2 สัปดาห์ ที่ปลูกในห้องทดลองโดยปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น ¼ เท่า ได้รับแสง 270 μ-moles/m^2/s เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าแอคติวิตีในใบข้าวทั้งที่ปลูกในดิน และปลูกในสารละลายธาตุอาหารมีลักษณะการแสดงออกที่เหมือนกันคือ มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับแสงโดยเพิ่มสูงที่สุดในช่วงเวลาเที่ยงวันจากนั้นจะลดต่ำลงในตอนเย็นและมีระดับต่ำค่อนข้างจะคงที่ตลอดช่วงเวลากลางคืนในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในรากข้าวกลับไม่มีการตอบสนองต่อแสงเหมือนในใบ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกับการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบ และรากข้าวบาร์เล่ย์ (Lewis *et al*., 1982) และ ในใบ และในรากของแตงกวา(*Cucumis sativus*) (Haba *et al*., 2001) ซึ่งพบว่าในพืชดังกล่าวมีการตอบสนองของแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาที่ได้รับแสง ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์นี้ในส่วนรากค่อนข้างคงที่ตลอดทั้ง 24 ชั่วโมง

การแสดงออกของเอนไซม์ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับการได้รับแสงนี้ อาจเป็นผลมาจากการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ทั้งในระดับ protein modification โดยผ่านทางผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสง นั่นคือในสภาวะที่มีแสง พืชจะมีการสะสมฟอสเฟตเอสเทอร์ เช่น glucose 6-phosphate หรือ fructose-1, 6-bisphosphate ซึ่งสารประกอบเอสเทอร์เหล่านี้ สามารถไปยังยั้งการทำงานของเอนไซม์NR-kinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเติมฟอสเฟตให้แก่เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่สามารถจับกับโปรตีนยับยั้งได้ (Bachmann *et al.*, 1995)

การควบคุมระดับ transcription ของเอนไซม์ จากการศึกษาการสังเคราะห์ mRNAของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในข้าวโพดพบว่าแสงจะเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ mRNA ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ภายในเวลาสองชั่วโมงหลังจากได้รับแสง (Huber *et al*., 1994) สำหรับในรากพบว่าไม่ได้รับอิทธิพลจากแสง อย่างไรก็ตามเนื่องจากส่วนของรากเป็นส่วนที่ไม่มีกิจกรรมการสังเคราะห์แสง อีกทั้งผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสงจากส่วนต้นมีการนำไปใช้เฉพาะส่วนมากกว่าจะส่งมาสะสมในราก ดังนั้นจึงพบว่าระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในส่วนนี้จึงค่อนข้างต่ำและไม่ขึ้นกับแสง

เมื่อเปรียบเทียบค่า specific activity ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวที่ปลูกในดินในสภาพธรรมชาติ และใบข้าวที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารในห้องทดลอง พบว่าค่าที่ได้ค่อนข้างจะใกล้เคียงกัน แม้ว่าในสภาพธรรมชาติต้นข้าวจะได้รับแสงในปริมาณที่มากกว่า ซึ่งหากจะพิจารณาเฉพาะปัจจัยของปริมาณแสงแล้ว พบว่า ระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มแสงในช่วง PAR (photosynthetically active radiation; 400-700 นาโนเมตร) ที่เพิ่มขึ้น (Netto *et al*., 1998) แต่อย่างไรก็ตามข้าวที่ปลูกในดินก็ยังต้องใช้รากสอดแทรกไประหว่างเม็ดดินเพื่อดูดซึมแร่ธาตุมาใช้ ดังนั้นเมื่อเทียบกับการปลูกข้าวในห้องทดลองซึ่งเป็นการปลูกในสารละลายธาตุอาหาร แม้ว่าจะได้รับแสงในระดับที่ต่ำกว่าแสงในธรรมชาติ แต่เนื่องจากรากข้าวสามารถดูดเอาแร่ธาตุเข้ามาใช้ได้เลย อีกทั้งในสารละลายธาตุอาหารยังมีปริมาณและชนิดของแร่ธาตุที่ค่อนข้างจะครบถ้วนที่พืชต้องการ จึงมีผลให้ต้นข้าวมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสูงในระดับที่ใกล้เคียงกับที่ปลูกในดินโดยได้รับแสงตามธรรมชาติ

4.2.2 ผลของช่วงเวลาที่ได้รับแสง และความสมบูรณ์ของธาตุอาหารต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากผลการทดลองพบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารโดยได้รับแสง 10 ชั่วโมงต่อวัน และ 12 ชั่วโมงต่อวัน มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในรูปแบบที่คล้ายคลึงกันคือ มีการเพิ่มของแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วงเวลาที่ได้รับแสงและลดลงในที่มืดแต่กลุ่มที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวันจะมีระดับแอคติวิตีสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับแสง 10 ชั่วโมงต่อวันเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ต้นข้าวมีช่วงเวลาในการสังเคราะห์แสงมากกว่า ทำให้ได้สารประกอบคาร์บอนซึ่งได้แก่

กลูโคสในปริมาณมากซึ่งมีผลในการกระตุ้นการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (Bachmann *et al*. ,1995)

เมื่อพิจารณาถึงระดับของธาตุอาหารร่วมด้วยจะพบว่า กลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารที่มากกว่า (ความเข้มข้น ½ เท่า) จะมีลักษณะการเพิ่มของเอนไซม์ไนเทรต รีดักเทสต่างกับกลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารน้อยกว่า (Hoagland ‘s solution ความเข้มข้น 1/20 เท่า) กล่าวคือ กลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารมากจะมีการเพิ่มของเอนไซม์ขึ้นอย่างรวดเร็วใน 3 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 9 ก่อนจะลดลง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารต่ำกว่าจะมีอัตราการเพิ่มของแอคติวิตีไปจนมีค่าสูงสุดที่เวลาเที่ยงตรงแล้วค่อยลดลง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองใน acata cotton โดยได้เปรียบเทียบระหว่างการได้รับไนเทรตความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์, 0.1 มิลลิโมลาร์ และ1 มิลลิโมลาร์ซึ่งพบว่าต้นที่ได้รับไนเทรต 0.05 มิลลิโมลาร์จะมีการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดใน ชั่วโมงที่ 5 ของการได้รับแสง จากนั้นจะลดลง ในขณะที่ การได้รับไนเทรตในสองความเข้มข้นที่เหลือจะมีการเพิ่มขึ้นภายในหนึ่งชั่วโมงหลังจากได้รับแสงจากนั้นจะมีค่าคงที่ไปจนถึง ชั่วโมงที่ 7 แล้วค่อยลดต่ำลง (Aslam *et al*., 2001) และจากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบระดับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสทั้งในกลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารสูงกับกลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารต่ำ พบว่ามีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสต่างกันเพียงเล็กน้อย แม้ว่าความเข้มข้นของแร่ธาตุจะต่างกันมากถึงสิบเท่าก็ตาม ซึ่งจากการทดลองของ Aslam และคณะดังกล่าว พบว่าการให้ไนเทรต 0.05 มิลลิโมลาร์ กับ 1 มิลลิโมลาร์ซึ่งแตกต่างกันถึง 20 เท่าก็ปรากฏว่ามีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตใกล้เคียงกันทั้งสองกลุ่ม ดังนั้นจากการทดลองจะเห็นว่าระดับความสมบูรณ์ของธาตุอาหารมีผลตอบสนองต่อแสงในลักษณะของรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในช่วงวันแต่ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อค่าแอคติวิตี

จากการทดลองเมื่อพิจารณาจากระดับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่มีค่าใกล้เคียงกันแม้จะได้รับธาตุอาหารมากหรือน้อย แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงซึ่งเป็นพันธุ์ทดสอบมีความสามารถในการปรับตัวได้ดีแม้ว่าจะปลูกในสภาวะที่ดินมีความอุดมสมบูร์สูงหรือ ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำก็ตาม

4.2.3 ผลการเติมอากาศในระบบการปลูกในสารละลายธาตุอาหารต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการทดลองพบว่าต้นข้าวที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค และมีการเติมอากาศให้กับสารละลายธาตุอาหาร จะมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวต่ำกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้เติมอากาศเพิ่ม ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Glaab and Kaiser, 1993; Kaiser and Huber (1994), Toucheffe and Burkholder (1992) และ Kaiser *et al*., (1999) ซึ่งพบว่าในการปลูกพืชในสารละลายในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำจะมีการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสอย่างรวดเร็ว และเมื่อเติมออกซิเจนลงไปจะทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าลดลง หรือในการทดลองของ Haba *et al*., (2001) ซึ่งพบว่า เมื่อเติมออกซิเจนในสารละลาย พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง ในขณะที่มีระดับของ ATP เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง ATP ที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลในการเพิ่มอัตราการเติมฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส อย่างไรก็ตาม ถ้าพืชไม่ได้รับออกซิเจนเลยจะมีผลให้มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมากซึ่งจะได้ไนไทรต์จำนวนมาก และเมื่ออัตราการรีดิวซ์ไนไทรต์ไม่สมดุลย์กับปริมาณไนไทรต์ที่มากเกินไปก็จะมีผลให้เกิดเป็นพิษต่อพืชได้ (Kaiser and Huber, 1994)

สำหรับการทดลองนี้ ในชุดที่ไม่ได้เติมอากาศพบว่าไม่ได้เกิดปัญหาต่อต้นพืช ทั้งนี้เนื่องจากระดับสารละลายที่ปลูกพืชอยู่ในระดับตื้น คือ สูงจากก้นถังประมาณ 4 เซนติเมตร ซึ่งอากาศสามารถละลายลงไปได้ ดังนั้นจึงทำให้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างต้นพืช โดยจะเห็นได้จากการมีความสูง และความยาวรากใกล้เคียงกับกลุ่มที่ปลูกโดยการเติมอากาศ (รูปที่ 14)

4.3 ผลของไนโตรเจน ในรูปของ ไนเทรต แอมโมเนียม และไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม

4.3.1 ผลของการได้รับไนโตรเจน ในรูปของไนเทรต ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง ดอกพยอม และ ขาวดอกมะลิ105

จากการทดลองศึกษาผลของการได้รับเฉพาะปุ๋ยไนเทรต พบว่า ข้าวไร่ทั้งสามสายพันธุ์ มีรูปแบบการตอบสนองต่อไนเทรตแตกต่างกัน โดยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์ดอกพยอมเมื่อได้รับไนเทรตปริมาณสูง จะมีการเพิ่มแอคติวิตีมากในช่วงเวลาสั้นๆ

ก่อน จากนั้นจะลดลง และเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ในขณะที่ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงไม่แสดงลักษณะเหมือนกับสองพันธุ์แรก ผลดังกล่าวอาจเกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันของระบบขนส่งไนเทรตสามชนิด (Aslam *et al*.,1992; Siddiqi *et al*., 1992; Glass *et al*., 2000) ได้แก่ iHATS(inducible high-affinity transport system), cHATS (constitutively high-affinity transport system) และ LAT(low affinity transport system) ซึ่งโดยทั่วไป iHATS มักถูก - ชักนำได้ด้วยไนเทรต และไนไทรต์ ซึ่งระดับการชักนำและช่วงเวลาการแสดงออกมีความแตกต่างกันตามชนิดของพืช จากการศึกษาในรากข้าวบาร์เล่ย์ พบว่า iHATS มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น 6-12 ชั่วโมง หลังจากได้รับไนเทรต หรือ ในรากของ white spruce และ lodgepole pine พบว่าต้องใช้เวลาสามวันในการชักนำให้ได้แอคติวิตีสูงสุด (Min *et al*., 1998) ขณะเดียวกัน cHATS ซึ่งปกติจะสามารถทำงานได้แม้ในสภาวะที่มีไนเทรตภายนอกต่ำ ก็สามารถเพิ่มระดับการทำงานได้ ถึงสามเท่าเมื่อได้รับการกระตุ้นจากไนเทรตจากภายนอกลำต้น (Aslam *et al*., 1992; Kronzucker *et al*., 1995a; Glass *et al*., 2000)ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง จึงเห็นได้ว่าช่วงแรกที่มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพิ่มขึ้นสูงในระยะเวลารวดเร็วและลดลงมาในใบข้าวไร่พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 เมื่อได้รับไนเทรต 5มิลลิโมล-ลาร์ (รูปที่ 15) หรือในพันธุ์ดอกพยอมเมื่อได้รับไนเทรตในปริมาณ 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 17) น่าจะเป็นผลจากการที่ cHATS ถูกกระตุ้น ซึ่งระดับการกระตุ้นอาจขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ด้วย โดยจะเห็นได้ว่าข้าวไร่สายพันธุ์กู้เมืองหลวงไม่ได้แสดงลักษณะเหมือนในข้าวสองสายพันธุ์แรก (รูปที่ 19) อย่างไรก็ตามเมื่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวทั้งสามสายพันธุ์หมดไป พบว่าการได้รับไนเทรตเพิ่มจะมีผลให้ต้นข้าวมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพิ่มขึ้นในอัตราที่รวดเร็ว ซึ่งอาจเป็นเพราะต้นข้าวจำเป็นต้องรีบใช้ไนเทรตมาชดเชยส่วนที่ขาดหายไป โดยพันธุ์กู้เมืองหลวงจะมีการเพิ่มของแอคติวิตีสูงที่สุด รองลงมาได้แก่พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์ดอกพยอม ตามลำดับ ซึ่งผล ดังกล่าวมีลักษณะเหมือนกับการตอบสนองของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าวที่ปลูกในดินต่อการได้รับปุ๋ยเพิ่ม

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของไนเทรตไม่มีความสัมพันธ์กับระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชอาจมีการใช้ไนเทรตในระดับที่พอเพียงต่อการเจริญของพืชเท่านั้น โดยไม่จำเป็นต้องใช้แร่ธาตุที่รับมาจากภายนอกให้ได้หมด และจากการติดตามระดับไนเทรตที่สะสมในต้นข้าวที่อายุต่างๆจะพบ

ว่า ระดับไนเทรตที่สะสมในต้นข้าวมีแนวโน้มลดลง เสริมให้เห็นว่าระดับไนเทรตที่สะสมในใบมีความสัมพันธ์กับระดับของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 16, 18 และ 20 จะเห็นว่าระดับไนเทรตที่สะสมในใบข้าวไม่มีความสัมพันธ์กับระดับของไนเทรตในสารละลาย ทั้งนี้เนื่องมาจากผลที่ได้มาจากการเก็บตัวอย่างที่เวลาเดียวกันใน 1 วัน แต่ระดับไนเทรตที่สะสมในใบพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาของวัน โดยจะมีค่ามากที่สุดในช่วงก่อนได้รับแสง จากนั้นจะลดลงเมื่อเริ่มได้รับแสง (Man *et al*., 1999) ดังนั้นเมื่อต้นข้าวอยู่ในสภาวะที่มีอาหารมากกว่า ก็จะทำให้รูปแบบของแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมีค่ามากและค่อนข้างคงที่มากว่าชุดที่มีอาหารน้อยกว่า (จากผลของตอนที่ 4.2.2) ส่งผลให้มีระยะเวลาในการใช้ไนเทรตได้มากกว่า จึงทำให้มีปริมาณไนเทรตเหลือน้อยในชุดที่มีไนเทรตในสารละลาย 5 มิลลิโมลาร์ และ ปริมาณไนเทรตเหลือสูงที่สุดในชุดที่มีไนเทรตในสารละลาย 1.25 มิลลิโมลาร์

สำหรับชุดควบคุมที่ปลูกในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน พบว่ามีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในระดับต่ำมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเกิดการปนเปื้อนของไนเทรตปะปนมากับสารเคมีตัวอื่นซึ่งมีปริมาณไม่มากพอที่จะวัดได้ และแม้ว่าจะมีไนเทรตเพียงเล็กน้อยก็อาจมีผลให้ต้นข้าวดูดซึมเข้าไปได้โดยตัวขนส่งไนเทรตที่มีความจำเพาะสูง ดังนั้นจึงมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสดังที่ปรากฏ

4.3.2 ผลของการได้รับไนโตรเจน ในรูปของไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง ดอกพยอม และ ขาวดอกมะลิ105

จากผลการทดลองพบว่าการได้รับทั้งไนเทรตและแอมโมเนียมจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่ทั้งสามสายพันธุ์ในลักษณะที่คล้ายกัน นั่นคือจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพิ่มขึ้นสองครั้ง โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่เพิ่มขึ้นช่วงแรกจะมีระดับค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับระดับแอคติวิตีที่เพิ่มขึ้นช่วงหลัง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงแรกต้นข้าวได้รับแอมโมเนียมซึ่งเป็นรูปที่สามารถนำไปใช้ได้เลย การใช้ไนเทรตจึงยังไม่มีความจำเป็นมากนัก นอกจากนี้แอมโมเนียมยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ตัวขนส่งไนเทรต (Glass *et al*., 2000) จึงทำให้มีไนเทรตในเซลล์น้อย และมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสน้อย แต่เมื่อแอมโมเนียมถูกใช้หมดไป ทำให้ต้นข้าวต้องหันมาใช้ไนเทรตเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักจึงมีการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสูง

ขึ้น อย่างไรก็ตามจะพบว่าระดับ แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวทั้งสามสายพันธุ์จะหมดลงในช่วงระยะเวลาเพียง 20 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นกว่า ชุดที่ได้รับเฉพาะไนเทรตเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งค่าแอคติวิตีจะหมดลงในระยะเวลา 40 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากระดับปริมาณไนเทรตในการทดลองชุดที่ใช้ร่วมกับแอมโมเนียมมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อถูกใช้ไปจึงหมดเร็ว

4.3.3 ผลของการได้รับไนโตรเจน ในรูปของแอมโมเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง ดอกพยอม และขาวดอกมะลิ105

จากการทดลอง พบว่าไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในทุกสายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจาก ต้นข้าวได้รับเฉพาะแอมโมเนียมซึ่งสามารถนำไปใช้ได้เลย และไม่มีไนเทรตในสารละลายดังนั้นจึงไม่มีการชักนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ผลจากการทดลองให้ไนโตรเจนในรูปแบบต่างๆกันโดยการพิจารณาเฉพาะแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าวทั้งสามสายพันธุ์ยังไม่อาจสรุปได้ว่า การให้ปุ๋ยแก่ข้าวไร่ทั้งสามสายพันธุ์ในรูปแบบใดจะดีที่สุด เนื่องจากต้นข้าวที่ปลูกในสารละลายที่มีเฉพาะไนเทรต หรือมีทั้งไนเทรตและแอมโมเนียม หรือมีเฉพาะแอมโมเนียมอย่างเดียว ก็ยังคงสามารถเติบโตได้โดยมีลักษณะทั่วไปไม่แตกต่างกัน ดังนั้น จากเดิมที่มีการแนะนำให้ใช้เฉพาะปุ๋ยแอมโมเนียม หรือปุ๋ยยูเรียในนาข้าว แต่ไม่ควรใช้ปุ๋ยไนเทรต (ชาญ มงคล, 2536) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองนี้ซึ่งพบว่าข้าวไร่ทั้งสามสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อการได้รับไนเทรตโดยการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสอย่างชัดเจน จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่จะนำไนเทรตมาใช้เป็นปุ๋ยข้าวไร่ เพื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้แก่ต้นข้าวอีกทางหนึ่งโดยอาจให้ในลักษณะของปุ๋ยเดี่ยวหรือ ปุ๋ยผสมระหว่างแอมโมเนียมและไนเทรต ซึ่งจะต้องทดสอบในพื้นที่จริงต่อไป

4.4 ผลการสกัดเอนไซม์ และทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ในการสกัดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง พบว่าจะได้ค่า specific activity ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract ต่างกันในแต่ละครั้งของการทดลอง ซึ่งค่า specific activity ของเอนไซม์นี้จะขึ้นอยู่กับอายุของต้นข้าวไร่ด้วย อย่างไรก็ตามก่อนการสกัดได้มีการให้ปุ๋ยแก่ต้นข้าว เพื่อกระตุ้นให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ในใบข้าวก่อนการสกัด และเพื่อความมั่นใจว่าจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมากพอที่จะ

ศึกษา และเมื่อนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าที่ระดับเกลือ 20-50 % ของความอิ่มตัว มีความเหมาะสมในการแยกเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสออกมาได้ โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.61 เท่า แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองทำบริสุทธิ์เอนไซม์ต่อไปด้วย Blue-sepharose column chromatographyกลับไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากแอค-ติวิตีของเอนไซม์ที่ออกมาจากคอลัมน์หายไป แม้ว่าจะได้ทดลองใช้ตัวชะที่หลากหลายแล้วก็ตาม ซึ่งข้อผิดพลาดอาจเกิดจากสภาวะที่ทำการทดลองยังไม่เหมาะสมและต้องใช้เวลาในการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปอีก อย่างไรก็ตามจากการทดลองชะด้วยตัวชะต่างๆ พบว่าเมื่อนำส่วนที่ชะออกจากคอลัมน์ไปทำอิเล็กโตรฟอริสิสแบบไม่เสียสภาพ พบว่ามีโปรตีนไม่น้อยกว่า 5 ชนิดที่สามารถจับกับ blue sepharose ได้

4.5 การย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสบนแผ่นเจล

สำหรับการทดลองย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส พบว่า สีของผลิตภัณฑ์ซึ่งควรจะติดอยู่กับแผ่นเจลในบริเวณที่มีเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส กลับแพร่กระจายออกมาในส่วนของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสอยู่บริเวณใดของแผ่นเจล อย่างไรก็ตามแม้ว่าการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสวิธีนี้จะประสบปัญหา แต่ก็ได้พยายามทดลองย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยการอาศัยจากคุณสมบัติ partial activity ซึ่งโมเลกุลของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในส่วนของ molybdenum domain สามารถที่จะรับอิเล็กตรอนจาก bromophenol blue ได้ ซึ่งในการทดลอง ภายหลังจากนำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือและนำเกลือออกแล้วมาทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในหลอดทดลอง แล้วนำมาทำ electrophoresis บน 7% acrylamide จากนั้นได้นำแผ่นเจลมาเคลือบด้วยแป้งมันที่ผสม bromophenol blue ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน พบว่าแผ่นเจลปรากฏมีแถบใสอยู่บนพื้นสีม่วง ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชั่นของ bromophenol blue และเมื่อนำมาย้อมโปรตีนปรากฏแถบของโปรตีนในบริเวณเดียวกัน (ไม่ได้แสดงรูป) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแถบของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้เป็นเพียงการทดลองคร่าวๆเพื่อหาแนวทางในการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส และวิธีการนี้ยัง จำเป็นต้องได้รับการปรับปรุงอีกมากเพื่อให้มีความน่าเชื่อถือ ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สำหรับนักวิจัยที่สนใจจะได้ศึกษาต่อไป

4.6 การศึกษาข้อมูลพื้นฐาน และคุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่

4.6.1 ผลของอุณหภูมิต่อการรักษาสภาพของเอนไซม์ในตัวอย่างที่ยังไม่ได้สกัดที่อุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษาพบว่าการเก็บรักษาตัวอย่างใบข้าวที่บดไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสสามารถเก็บได้นานที่สุด ในขณะที่การเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องจะไม่สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้เลย สำหรับผลการทดลองนี้พบว่าในช่วงระยะเวลาสามสิบวันของการเก็บรักษาตัวอย่างใบข้าวจะมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ แต่กลับลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงหลัง ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากความผิดพลาดของระบบไฟฟ้า ซึ่งในช่วงที่ทำการทดลอง มีการเกิดไฟฟ้าดับบ่อยครั้ง ซึ่งจะมีผลให้อุณหภูมิของตู้เก็บตัวอย่างเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งหากไม่มีข้อผิดพลาดจากการที่ไฟฟ้าดับ คาดว่าระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างน่าจะนานกว่าที่ปรากฏในผลการทดลอง สำหรับในแต่ละการทดลอง ผู้ทดลองได้เลือกเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ให้เสร็จไม่เกินระยะเวลา 1 สัปดาห์หลังจากเก็บตัวอย่าง เพื่อให้ได้ค่าแอคติวิตีที่ผิดพลาดน้อยที่สุด

4.6.2 ผลของPMSFต่อความเสถียรของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในcrude extract

จากการทดลอง พบว่าการเติม PMSF ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase จะมีผลต่อการรักษาสภาพของเอนไซม์ที่เก็บบนน้ำแข็งไว้ได้นานประมาณ 5 ชั่วโมงโดยมีการเปลี่ยนแปลงของแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยมากเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่เติม PMSF ดังนั้นในการทำการทดลองที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้อง เติมสารป้องกันการทำงานของเอนไซม์ proteinase เพราะเอนไซม์ไนเทรต รีดักเทสเสียสภาพได้ง่ายในเวลารวดเร็ว (รูปที่ 25)

4.6.3 การเก็บรักษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัวในรูปของ dialysate และรูปที่จับกับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการทดลองจะเห็นว่า การเก็บรักษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในรูปที่จับกับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จะช่วยรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้นานกว่าการเก็บในรูปของ dialysate ที่อุณหภูมิเดียวกัน นอกจากนี้ยังได้ทดลองเก็บรักษา

เอนไซม์ในสภาวะแช่แข็งพบว่า เมื่อนำเอนไซม์มาหาแอคติวิตีหลังจากแช่แข็ง 1 คืนพบว่าค่าแอคติวิตีหายไปหมด ในขณะที่ชุดที่ไม่แช่แข็งกลับยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูง

4.6.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติNAD(P)H–bispecificของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการศึกษาค่า K_m ของสับสเตรท ได้แก่ KNO_3 , NADH และ NADPH โดยการหาจาก Lineweaver-Burk double reciprocal plot ดังรูปที่ 20-23 พบว่าค่า K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีค่า 0.109 มิลลิโมลาร์ ค่า K_m ของ NADH มีค่า 0.018 มิลลิโมลาร์, ค่า K_m ของ KNO_3 มีค่า 2.5 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และค่า K_m ของ NADPH มีค่า 0.05 มิลลิโมลาร์ จากผลจากการทดลอง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสามารถใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ การใช้ NADPH และนอกจากนี้ในกรณีของการใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนยังต้องใช้ไนเทรตในปริมาณที่มากกว่าการใช้ NADH และโดยทั่วไปพบว่าในต้นข้าว จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากการได้รับอิเล็กตรอนจาก NADH และในช่วงปลายของการเจริญของต้นข้าว จึงจะพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากการรับอิเล็กตรอนมาจาก NADPH ซึ่ง Barlaan (1998) ได้รายงานว่า NADH-NR และ NADPH-NR มีการทำงานในคนละช่วงการเจริญของข้าว และการที่เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส มีหลายไอโซฟอร์มก็เพื่อความเหมาะสมในการตอบสนองเมื่อได้รับไนเทรต หรือเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความหลากหลาย

4.6.5 การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดัก

เทสใน crude extract และ 20-50 % ammonium precipitateจากการศึกษาพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ทั้งในส่วนของ crude extract และ 20-50 % ammonium precipitate คือ ที่พีเอช 7.5 โดยในส่วนของ crude extract ค่าแอคติวิตีจะมีอยู่ในช่วงพีเอช 6-11 และในส่วนของ 20-50 % ammonium precipitate ค่าแอคติวิตีจะมีอยู่ในช่วงพีเอช 4-12 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าช่วงของค่าพีเอชที่แสดงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract จะแคบกว่า ใน 20-50 % ammonium precipitate ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ในส่วนของ crude extract มีโปรตีนตัวอื่นที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส และสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชนี้เช่นกัน และเมื่อนำ crude extract ไปแยกเอาโปรตีนบางส่วนออกไป ก็อาจมีผลให้โปรตีนที่

จะมายับยั้งการทำงานของเอนไซม์หายไปจึงทำให้เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมีแอคติวิตีในช่วงที่กว้างกว่าเดิม

4.6.6 ผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการศึกษาพบว่า การเติม molybdenum จะมีผลในการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมากกว่าการเติม FAD ซึ่งจากการเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมทั้ง FAD และ molybdenum พบว่ามีค่าแอคติวิตีน้อยมาก แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการสกัดจนผ่านกระบวนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ น่าจะมีการสูญเสีย molybdenum ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสไปมากกว่าการสูญเสีย FAD ซึ่งผลการทดลองเห็นว่า การเติม molybdenum มีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้อย่างชัดเจนและจากผลการทดลองเก็บเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสโดยการเติมและไม่เติม FAD พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสชุดที่เติม FAD มีค่ามากว่าชุดที่ไม่เติม FADเล็กน้อย ซึ่งการเพิ่ม FAD นี้มีผลให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไนเทรต-รีดักเทสให้โมเลกุลสมบูรณ์ขึ้น อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่า FAD ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสลายตัวของเอนไซม์ ไนเทรตรีดักเทส

4.6.7 การศึกษาผลของ Mg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการทดลองพบว่า Mg^{2+} มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยการใช้ Mg^{2+}10 มิลลิโมลาร์ จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้ถึง 53.3 % ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Aguera *et al.* (1999), Weiner *et al.* (2000), Larios (2001) และHaba *et al.* (2001) ซึ่งอธิยายได้ว่า ในสภาวะที่มี Mg^{2+} จะช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ Kinase ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวสามารถเติมฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้ และส่งผลให้โปรตีน 14-3-3 ซึ่งเป็นโปรตีนยับยั้งสามารถเข้ามาจับกับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

4.6.8 ผลของ sodium azide (NaN_3) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการทดลองโดยใช้ sodium azide ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้นในหน่วยไมโครโมลาร์ก็มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรต

รีดักเทสได้ โดยสามารถยับยั้งได้ถึง 100 % ที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Yamamoto *et al.*(1986) ซึ่งได้รายงานผลของ sodium azide ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้ถึง 88 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาต่อมาโดย Butler *et al*. (1999) ได้รายงานว่า azide สามารถจับกับส่วนของ molybdenum บนโมเลกุลของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้

4.6.9 การศึกษาผลของ 5′ -AMP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการศึกษาผลของ 5′-AMP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันทั้งในสภาวะที่มี Mg^{2+}และไม่มี Mg^{2+} พบว่า 5′-AMP ไม่มีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส อย่างไรก็ตาม จากการทดลองของ Haba *et al*. (2001) พบว่า ในสภาวะที่มี Mg^{2+} การเติม 5′ AMP จะมีผลเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพียงเล็กน้อยแต่ไม่ต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ 5′ AMP และในสภาวะที่ไม่มี Mg^{2+} ก็พบว่าให้ผลเหมือนกัน